

不同杂交瘤细胞株单链抗体的构建及性质比较

胡莉¹, 刘爱平², 王小红^{*3}

(1. 黄淮学院 生物与食品工程学院, 河南 驻马店 463000; 2. 四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014; 3. 华中农业大学 食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 不同的杂交瘤细胞株, 分泌的抗黄曲霉毒素单克隆抗体的灵敏度也大不相同, 通过筛选获得三株杂交瘤细胞, 分别命名为 2C10、2E6 和 2H1, 其中 2C10 分泌的单克隆抗体在酶联免疫吸附(ELISA)试验中具有最高的灵敏度, 2E6 次之, 2H1 再次之。为了能够更好的展现和理解抗体和抗原之间的反应关系, 以及最大程度的提高重组抗体的灵敏度, 实验通过构建 3 株细胞株的单链抗体, 并在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达纯化单链抗体蛋白质, 采用竞争 ELISA 法展现了不同的单克隆抗体与所对应的单链抗体灵敏度之间的关系。结果表明, 灵敏度最好的单克隆抗体 2C10 所对应的单链抗体, 其灵敏度也是最好的, 2E6 的次之, 2H1 的再次之。同时实验也表明, 人工合成的单链抗体的灵敏度较其所对应的单克隆抗体的灵敏度要下降许多。

关键词: 黄曲霉毒素 B1; 单克隆抗体; 单链抗体; ELISA

中图分类号: Q 786 文章编号: 1673-1689(2019)11-0070-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.010

Constrcution and Comparison of Anti-AFB1 ScFv from Different Hybridoma Cell Lines

HU Li¹, LIU Aiping², WANG Xiaohong^{*3}

(1. College of Biological and Food Engineering, HuangHuai University, Zhumadian 463000, China; 2. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 3. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Anti-AFB1 Monoclonal antibody secreted by the different hybridoma cell lines have different sensitivity, three different hybridoma cell lines named 2C10, 2E6 and 2H1 were screened and studied, the result of enzyme-linked immunosorbent (ELISA) test showed that the sequence of the sensitivity of monoclonal antibodies secreted by 2C10, 2E6 and 2H1 was 2C10>2E6>2H1. Three anti-AFB1 scFvs from different hybridoma cell lines were constructed and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) respectively in order to better show and understanding the relationship between antigen and antibody and improve the sensitivity of recombinant antibodies at the greatest extent. The ELISA method was used to detect the sensitivity relationship between the different monoclonal antibodies and anti-AFB1 scFvs after protein expression and purification. The result showed that the sequence

收稿日期: 2017-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271876)。

* 通信作者: 王小红(1970—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全、食品生物技术方面的研究。E-mail: wxh@mail.hzau.edu.cn

引用本文: 胡莉, 刘爱平, 王小红. 不同杂交瘤细胞株单链抗体的构建及性质比较[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 70-77.

of the sensitivity of anti-AFB1 scFvs was scFv-2C10>scFv-2E6>scFv-2H1, and showed that the sensitivity of monoclonal antibodies were much better than the corresponding anti-AFB1 scFvs.

Keywords: AFB1, monoclonal antibody, scFv, ELISA

黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 主要是由产毒黄曲霉、寄生曲霉和集峰曲霉产生的具有极高毒性的次生代谢产物。AFB1 可以在农作物生长、收获、贮藏、运输和销售等任何环节中产生,并由此直接进入食物链,造成淀粉类食品、动物性食品与肉、蛋、奶等的交叉污染。AFB1 对人和动物的肝脏具有很强的毒性,是国际公认的致癌物质^[1]。因此,AFB1 的检测与分析技术的研究是非常必要的。到目前为止,关于 AFB1 分析检测方法的研究报道很多,如薄层层析法、高效液相色谱法、纳米金标记法、免疫亲和柱法和近红外光谱法^[2-5]。免疫化学分析法因具有快速、简单、灵敏、针对性强等优点而被广泛应用,在这些检测方法中,其中 ELISA 法要求有较高质量的抗体^[6-13]。

在过去的十年里,在抗黄曲霉毒素多克隆抗体的基础上,对半抗原具有不同亲和力的抗黄曲霉毒素单克隆抗体应运而生。在免疫检测方法中,抗原和抗体之间的高亲和力是非常重要的。随着抗体技术的发展,重组抗体尤其是单链抗体 (ScFv) 已经运用到黄曲霉毒素的检测中^[14]。重组抗体具有成本低、易于操作的亲和力和灵敏度的特点。而且,通过定点突变的方法可以提高抗体亲和力。

单链抗体 (single chain Fv antibody fragment, ScFv) 是由抗体的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 通过一段约 45~75 个碱基组成的柔性肽 (Linker) 连接而得到的^[15-17],是一种新型重组小分子抗体蛋白质。scFv 仅为完整抗体的 1/6 大小,由于其相对分子质量小,结构单位小,因此其组织穿透力强,免疫原低,可在多种表达系统中表达,具有成本低,血流中半衰期短等特点,在医学和生物学领域中的应用极为广泛^[18-21]。又由于 scFv 易于制备、无 Fc 段引起的非特异性反应、易于改造且表达产量高而获得了研究学者们的广泛关注。scFv 中的 VH 和 VL 来源于不同的杂交瘤细胞,构建成的 scFv 的灵敏度、特异性等生物活性也有所不同。

作者所在实验室通过大量筛选,最后得到几株能稳定分泌抗黄曲霉毒素单克隆抗体的三株杂交

瘤细胞株 (2C10、2E6 和 2H1),在这些细胞中,2C10 杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体表现有最高的灵敏度,2E6 次之,2H1 再次之。分别提取杂交瘤细胞的总 RNA,设计通用引物,采用分子生物学技术分别克隆其相应的重链可变区 (heavy chain variable region, VH) 和轻链可变区 (light chain variable region, VL) 基因,以一段连接肽 (Linker) 将 VH 和 VL 连接起来,组装成三种不同的 scFv 基因。将通过融合 PCR 构建的 scFvs 在大肠杆菌表达系统中进行蛋白质表达,纯化蛋白质后通过竞争 ELISA 法展现不同的单克隆抗体与所对应的单链抗体灵敏度之间的关系;另外分别对编码单链抗体的 3 种可变区基因 (VH/VL) 进行克隆和测序,并对此做核酸同源性分析和氨基酸同源性分析。通过可变区基因序列的比对,比较 VH 和 VL 来源的不同对 scFv 生物活性的影响,初步探究具有高灵敏度蛋白质的碱基结构组成,以便后续改善和提高重组抗体的灵敏度,并获得更高灵敏度的重组抗体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

AFB1: 购于瑞士 Alexis 公司; 杂交瘤细胞株 2C10、2E6、2H1 和 *E.coli* 菌株 Trans5 α 、表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3) 及表达载体 pET-30a: 为作者所在实验室常规保存; Easy Taq 酶、Trans2K Plus DNA Marker、Trans5K Plus DNA Marker: 购于中国北京金式金生物技术有限公司; 限制性内切酶、DNA 连接酶、PMD19-T Simple Vector: 购自 TaKaRa 公司; 质粒小提、DNA 凝胶回收试剂盒: 购自杭州 AxyGen; 引物: 南京金斯瑞生物科技有限公司合成; 羊抗小鼠 IgG-HRP 酶标二抗: 购于中国华美生物工程公司; 质粒提取试剂盒: 购于中国北京擎科新业生物技术有限公司; Ni-NTA 亲和层析填料、ECL 显色液、Page Ruler Prestained Protein Ladder: 购于美国 Thermo 公司; DNA 凝胶回收纯化试剂盒: 购于中国北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计与目的基因扩增 活化并亚克隆实验室筛选保存的灵敏度分别为 9.54、85.76、203.00 ng/mL^[22] 的三株杂交瘤细胞株 2C10、2E6 和 2H1, 收集 8×10^6 杂交瘤细胞, 采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, USA) 分别进行总 RNA 的提取。以 oligo-dT18 为引物, 经反转录 PCR (RT-PCR) 获得三种不同的单链 cDNA。RT-PCR 反应体系为 25 μ L: 5 μ L 的 5 $\times$ primerscript buffer, 1 μ L 的 50 mmol/L oligo-dT18, 2 μ L 的 2.5 mmol/L dNTP 溶液, 0.5 μ L 的 RNase inhibitor, 5 μ L 的总 RNA, 以及 0.5 μ L 的 primerscript RTase (200 U/ μ L), 11 μ L 的 DEPC 处理过的 ddH₂O。RT-PCR 反应程序为: 25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 1 h, 70 $^{\circ}$ C 15 min。

分别以已经获得的 cDNA 为模板, 以 VH-FOR、VH-Back、VL-FOR 和 VL-Back 为引物^[23-24], PCR 扩增 VH 和 VL 基因, 见表 1。将获得的 VH 和 VL 基因片段分别连接到载体 pMD19-T 上, 将获得的重组载体 pMD19-T-VH 和 pMD19-T-VL 转化到 *E. coli* Trans5a 细胞中, 以便基因测序。

以已经测序成功的重组质粒 pMD19-T-VH-2C10/2E6/2H1 和 pMD19-T-VL-2C10/2E6/2H1 分别为模板, 设计相应的引物, 采用重叠延伸 PCR (gene splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR) 扩增 scFv-2C10/2E6/2H1 基因片段^[25], 并在目的基因两端分别引入 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点。

首先, 以引物 1 和引物 2 为引物, PCR 扩增出 3 种带有部分 Linker 的 VH-Linker 片段; 以引物 3 和引物 4 为引物, PCR 扩增出 3 种带有部分 Linker 的 Linker-VL 片段。PCR 扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s), 28 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。每轮 PCR 后, 将 3 μ L PCR 产物与 1 μ L 6 $\times$ Loading buffer 混匀, 采用 0.8 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳分析并借助凝胶回收试剂盒分别纯化回收不同的 PCR 产物 VH-Linker 和 Linker-VL。然后, 通过 SOE-PCR 构建 scFv-2C10/2E6/2H1 基因。SOE-PCR 分两步: 第一步, 以上述回收的产物 VH-Linker 和 Linker-VL 为模板进行 PCR 扩增反应, 将 VH 和 VL 通过 Linker 连接合成一条单链。PCR 扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s), 10 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。经 0.8 g/dL 的

琼脂糖凝胶电泳分析并纯化回收 PCR 产物。第二步, 以第一步纯化产物为模板, 以引物 1 和引物 4 为引物, 分别 PCR 扩增 scFv-2C10/2E6/2H1 基因。PCR 扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。经 0.8 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳分析并分别纯化回收 PCR 产物。根据基因来源的不同, 最后获得 3 种不同的 PCR 产物, 即为 *Nco* I - scFv-*Xho* I -2C10、*Nco* I -scFv-*Xho* I -2E6 和 *Nco* I -scFv-*Xho* I -2H1。

表 1 VH、VL 和 scFv 基因 PCR 扩增、克隆所用的引物序列
Table 1 Nucleotide sequences and primers used for VH, VL and scFv amplification, cloning, and subcloning

引物名称	序列(5'-3')	大小/bp
VL-FOR1	CTTGGGCTGACCTAGGACAGT	21
VL-FOR2	CCGTTTYAKYTCCARCTT	18
VL-FOR3	GGATACAGTTGGTGCAGCATC	21
VL-Back1	CAGGCTGTTGTGACTCAGGAA	21
VL-Back2	GATRTTKTGATRACSCA	17
VL-Back3	GAY ATTGTGMTRACYCARTCT	21
VL-Back4	GAY ATCCAGMTGACWCAGWCT	21
VL-Back5	CAAATTGTTCTCACCCAGTCT	21
VH-FOR1	TGCAGAGACAGTGACCAGAGT	21
VH-FOR2	TGAGGAGACTGTGAGAGTGGT	21
VH-FOR3	TGAGGAGACGGTGACYGWGGT	21
VH-FOR4	CAGGTRCAGCTGCAGGAGTCAGG	23
VH-Back1	GATGTGAAGCTTCAGGAGTC	20
VH-Back2	CAGGTGCAGCTGAAGSAGTC	20
VH-Back3	CAGGTTACTCTGAAAGAGTC	20
VH-Back4	GAGGTCCAGCTGCARCARTC	20
VH-Back5	GAGGTGAAGCTGGTGGARTC	20
VH-Back6	TGMGGAGACGATGACCRTGGTCCC	24
引物 1	CATGCCATGCGCGAGGTGAAGCTGGTGGAG ^a	30
引物 2	CCCACCGCCGGATCCACCCGCCCCGAGCCACCG CCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT ^b	60
引物 3	GGCGGTGGTGGATCCGGCGGTGGCGGTGCCAGG CTGTTGTGACTCAGGAA ^c	51
引物 4	CCGCTCGAGTTAGTGGTGATGCTGATGCTTGG GCTGACCTAGGACACT ^d	51

a: 横线的为 *Nco* I 酶切位点; b: 横线的为 linker 序列; c: 横线的为 linker 序列; d: 横线的为 *Xho* I 酶切位点, 双线的为 histag 序列。

1.2.2 重组质粒 pET-30a-pelB-scFv-2C10/2E6/2H1 的构建和鉴定 PelB 信号肽可以引导蛋白质产物在细胞周质表达, 为了方便后续的蛋白质纯化

工作,现将 pET-22b 载体上的 pelB 信号肽序列克隆到最终使用载体 pET-30a 上,方法分为两步。首先将“1.2.1”中第二步获得的 PCR 产物 *Nco* I -scFv-*Xho* I -2C10、*Nco* I -scFv-*Xho* I -2E6、*Nco* I -scFv-*Xho* I -2H1 和质粒 pET-22b 均采用限制性内切核酸酶 *Nco* I 和 *Xho* I 进行双酶切,纯化回收产物后,采用 DNA 连接酶将 scFv-2C10/2E6/2H1 和 pET-22b 进行连接获得重组质粒 pET-22b-scFv-2C10/2E6/2H1,并转化 *E. coli* Trans5 α 细胞。挑取单克隆进行菌落 PCR 验证。

然后提取上述阳性克隆子 pET-22b-scFv-2C10/2E6/2H1 的质粒,纯化后将重组质粒 pET-22b-scFv-2C10/2E6/2H1 和质粒 pET-30a 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切,纯化回收产物后,采用 DNA 连接酶将 pelB-scFv-2C10 和 pET-30a 进行连接,获得重组质粒 pET-30a-pelB-scFv-2C10/2E6/2H1 并转化 *E. coli* Trans5 α 细胞。挑取单克隆进行菌落 PCR 验证,选取阳性转化子送至南京金思瑞生物科技有限公司测序。

测序正确的阳性转化子培养并提取质粒后,将空载体 pET-30a 和所提取质粒分别转化到 BL21 (DE3)感受态细胞中,挑取菌落转化子进行 PCR 验证,阳性转化子分别命名为 BL21 (DE3)-pET-30a 和 BL21(DE3)-pET-30a-pelB-scFv-2C10/2E6/2H1。

1.2.3 重组质粒 pET-30a-pelB-scFv 的表达及鉴定
无菌条件下挑取 1.2.2 中转化成功的单菌落转化子 BL21 (DE3)-pET-30a 和 BL21 (DE3)-pET-30a-pelB-scFv-2C10/2E6/2H1,分别培养于 100 mL 液体 LB 培养基中(含有 100 μ L 的 50 mg/mL 的 kana),于 200 r/min、37 $^{\circ}$ C 条件下培养至 OD_{600 nm} 为 0.8 左右时,加入诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),并使其终浓度为 1 mmol/L,16 $^{\circ}$ C 诱导表达 20 h。多次试验发现,诱导时间为 20 h 时蛋白质表达量达到最高。收集菌体,进行蛋白质预表达分析实验。

由于 pelB 信号肽的存在,所以基本确定目的蛋白质主要存在于细胞周质内。又由于只有当新生肽链的合成速率大于蛋白质折叠速率时,蛋白质才会以包涵体的形式存在,而肽链的合成速率又与温度有着直接的关系,选择 16 $^{\circ}$ C 低温诱导蛋白质的表达可以有效地避免包涵体形式的形成,且实验证明的确如此。

采用 SDS-PAGE 对 scFv-2C10/2E6/2H1 的预表达情况进行验证分析,将破碎后的菌体细胞于 4

$^{\circ}$ C 低温离心,可溶性蛋白质经镍柱亲和层析法进行蛋白质纯化,纯化后的蛋白质与上样缓冲液混匀后煮沸 6 min 直接上样,经 SDS-PAGE 验证后,接着转印 PVDF 膜,再以 5% 牛奶封阻 PVDF 膜,最后采用羊抗小鼠 IgG-HRP 酶标二抗孵育后,利用 ECL 显色液显色,观察结果。

1.2.4 抗 AFB1 scFvs-2C10/2E6/2H1 的性质分析
以 20 mL PBS 缓冲溶液悬浮,在冰浴条件下将细胞超声破碎(30 min,功率 105 W,2 s 开启,2 s 关闭),4 $^{\circ}$ C 下 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,采用镍柱亲和层析纯化上清液,纯化后所得到的蛋白质经 SDS-PAGE 初步验证后,再以间接竞争 ELISA 检测上述两种表达载体所表达的目的蛋白质抗 AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1 的灵敏度,试验中以 pET-30a 空载体的表达为阴性对照。

用 CBS 缓冲液稀释 AFB1-OVA 为 1 μ g/mL,包被 96 孔板过夜,PBST 洗涤甩干。每孔加入 200 μ L 封阻液,37 $^{\circ}$ C 静置 2 h,甩干封阻液,PBST 洗涤甩干。每孔加入 90 μ L 用 PBST 稀释的抗 AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1 和 10 μ L 以 PBS 稀释的不同质量浓度的 AFB1 溶液(质量浓度分别为 2、8、20、40、60 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 静置 1 h,甩干液体,PBST 洗涤甩干。每孔加入 100 μ L 的羊抗鼠 IgG-HRP 酶标二抗(以 PBST 4 000 倍稀释),37 $^{\circ}$ C 静置 1 h,甩干液体,PBST 洗涤甩干。每孔加底物缓冲液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 静置 15 min,每孔加入 50 μ L、2 mol/L H_2SO_4 终止反应,492 nm 测吸光值。

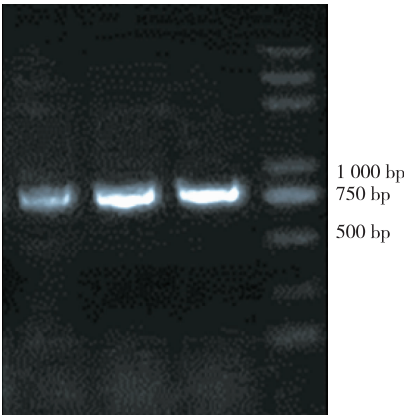
2 结果与分析

2.1 目的基因 scFv-2C10/2E6/2H1 扩增

以质粒 pMD19-T-VH-2C10/2E6/2H1 和 pMD19-T-VL-2C10/2E6/2H1 分别为模板,经 SOE-PCR 第一步扩增产物为模板,进行第二步 PCR,获得两端带有酶切位点的产物 scFv-2C10/2E6/2H1 基因。经 0.8 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测,大小约为 750 bp,与理论值一致,见图 1。回收试剂盒回收 scFv-2C10/2E6/2H1 基因片段。

2.2 株间氨基酸序列同源性比较

由于三种 VH 氨基酸和 VL 氨基酸均来自于杂交瘤细胞,且单克隆抗体的灵敏度高低顺序为 2C10>2E6>2H1,因此使用 NCBI Blast 分析比对各株间 VH、VL 氨基酸序列的同源性,比对分析结果分别见表 2~3。



M:Trans5K DNA Marker; 1:scFv-2C10 基因片段; 2:scFv-2E6 基因片段; 3:scFv-2H1 基因片段.

图 1 scFv-2C10/2E6/2H1 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR results of amplification scFv-2C10/2E6/2H1

表 2 不同 VH 氨基酸序列比较分析

Table 2 Homology analysis of different VH amino acid sequence

细胞株	株间同源性/%
2C10, 2H1	42.74
2C10, 2E6	100
2E6 , 2H1	42.74

表 3 不同 VL 氨基酸序列比较分析

Table 3 Homology analysis of different VL amino acid sequence

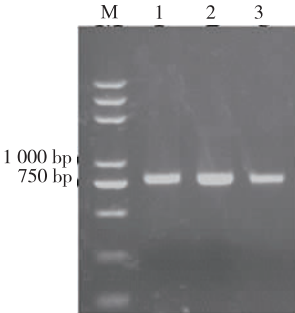
细胞株	株间同源性/%
2C10, 2H1	42
2C10, 2E6	43
2E6 , 2H1	59

由表 2~3 可知, 菌株 2C10 和 2E6 之间的重链可变区氨基酸序列的同源性是 100%, 与 2H1 的同源性只有 42.74%; 2H1 和 2C10、2E6 和 2C10 之间的轻链可变区氨基酸序列的同源性分别为 42% 和 43%, 而 2E6 和 2H1 之间的同源性可以达到 59%。相同的重链, 不同的轻链对单链抗体的生物活性也有一定的影响。

2.3 重组质粒 pET-30a-pelB-scFv 的构建及鉴定

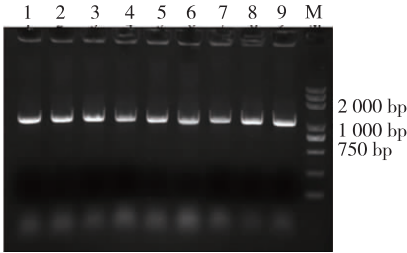
将 pET-30a 质粒和回收产物 pelB-scFv-2C10/2E6/2H1 分别进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切反应和连接反应, 获得重组质粒 pET-30a-pelB-scFv。将重组质粒转化到 *E.coli* Trans5 α 细胞, 挑取转化子, 以引物 1 和引物 4 对其进行菌落 PCR 验证, 见图 2(a)。PCR 产物大小约为 750 bp, 与理论预期值一致。测序结果进一步验证了重组质粒构的建成功。

将测序成功的阳性转化子 pET-30a-pelB-scFv 和空质粒 pET-30a 分别转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 转化子进行 PCR 验证, 见图 2(b), PCR 产物大小约为 750 bp, 与理论值一致。



M: Trans5K Plus DNA Marker; 1: 含有 scFv-2C10 基因的转化子; 2: 含有 scFv-2E6 基因的转化子; 3: 含有 scFv-2H1 基因的转化子.

(a)



M: Trans5K Plus DNA Marker; 1-3: 含有 scFv-2C10 基因的不同转化子; 4-6: 含有 scFv-2E6 基因的不同转化子; 7-9: 含有 scFv-2H1 基因的不同转化子.

(b)

图 2 含目的基因的转化子 PCR 验证结果

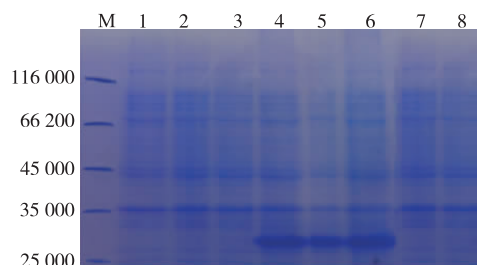
Fig. 2 PCR results of transformants containing target gene

2.4 重组质粒 pET-30a-pelB-scFv 的表达及鉴定

挑取固体 LB 平板上生长的阳性菌落进行诱导表达, 镍柱亲和和法纯化表达蛋白质, 采用 SDS-PAGE 和 Western blot 对抗 AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1 蛋白质进行验证, 结果见图 3。由图 3 可知, SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定结果表明已成功诱导表达了目的蛋白质, 该蛋白质相对分子质量约为 29 000, 与目的蛋白质理论值一致。BCA 法测定诱导 20 h 纯化后目的蛋白质的产率约为 34 mg/L。

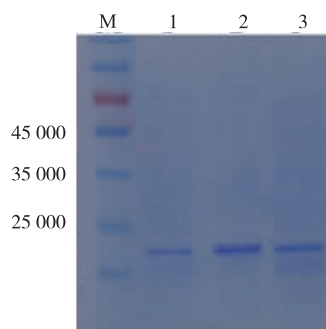
2.5 抗 AFB1scFv-2C10/2E6/2H1 的性质分析

分别以间接非竞争 ELISA 和间接竞争 ELISA 纯化后的 scFv-2C10/2E6/2H1 进行分析。间接非竞争 ELISA 表明, AFB1O-OVA 包被质量浓度为 1 μ g/mL, 抗 AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1 的质量浓度约为 0.17 mg/mL 时, OD_{492 nm} 约为 1.0。在此条件下, 以 AFB1 为竞争抗原, 进行间接竞争 ELISA 检测不同表达系统表达的目的蛋白质的灵敏度, 并取五点以



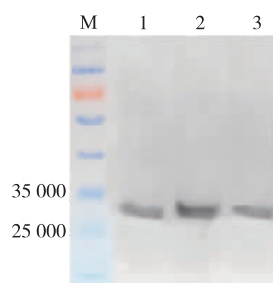
M: Marker; 1: 质粒pET-30a-pelB-scFv-2C10诱导前; 2: 质粒pET-30a-pelB-scFv-2E6诱导前; 3: 质粒pET-30a-pelB-scFv-2H1诱导前; 4: 质粒pET-30a-pelB-scFv-2C10诱导后; 5: 质粒pET-30a-pelB-scFv-2E6诱导后; 6: 质粒pET-30a-pelB-scFv-2H1诱导后; 7: 质粒pET-30a-pelB-scFv-2C10诱导后; 8: 质粒pET-30a-pelB-scFv-2H1诱导后。

(a)抗AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1表达的SDS-PAGE分析



M: Marker; 1: 纯化后蛋白质scFv-2C10; 2: 纯化后蛋白质scFv-2E6; 3: 纯化后蛋白质scFv-2H1。

(b)纯化后的抗AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1的SDS-PAGE分析



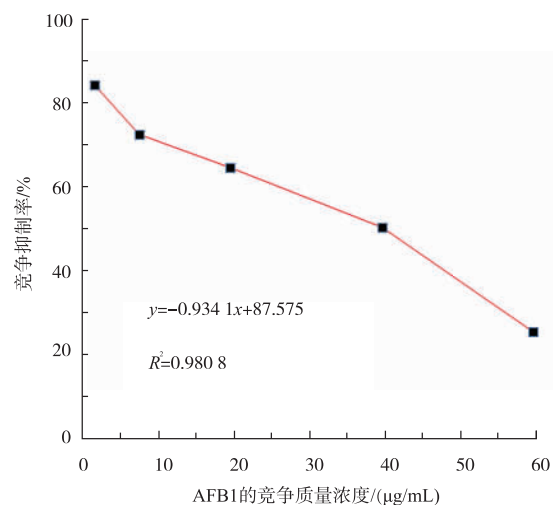
M: Marker; 1: Western-blot分析scFv-2C10结果; 2: Western-blot分析scFv-2E6结果; 3: Western-blot分析scFv-2H1结果。

(c)抗AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1表达的Western-blot分析

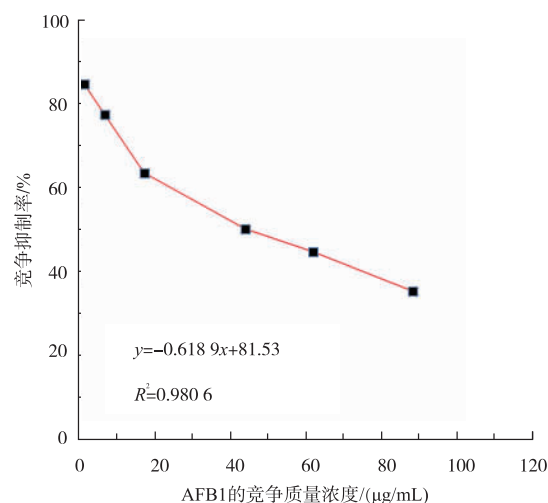
图3 抗AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1表达的SDS-PAGE和Western-blot分析

Fig. 3 SDS-PAGE and Western-blot analysis for expression of anti-AFB1 scFv-2C10/2E6/2H1

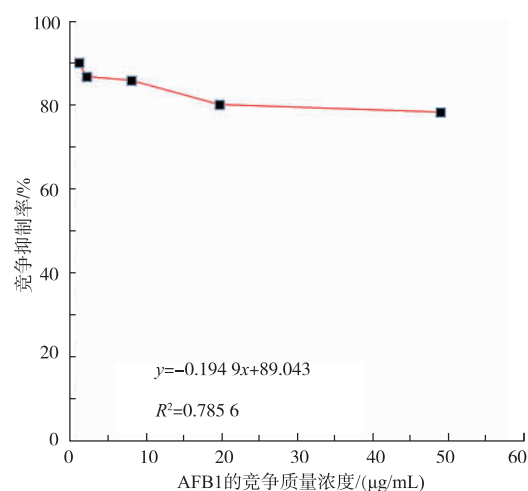
绘制scFv-2C10/2E6/2H1的间接竞争抑制曲线,由图4可知,目的蛋白质scFv-2C10/2E6/2H1的检测灵敏度分别约为40、50 $\mu\text{g/mL}$ 和大于50 $\mu\text{g/mL}$ 。可以看出,随着单克隆抗体灵敏度的下降,它所对应的单链抗体的灵敏度也随之降低。这表明scFv的灵敏度与其本身的VH和VL的基因组成相关,要想改变scFv的灵敏度,可以考虑改变其基因组成。



(a) pET-30a-pelB-scFv-2C10的间接竞争ELISA曲线



(b) pET-30a-pelB-scFv-2E6的间接竞争ELISA曲线



(c) pET-30a-pelB-scFv-2H1的间接竞争ELISA曲线

图4 scFv-2C10/2E6/2H1的间接竞争ELISA抑制曲线
Fig. 4 IC-ELISA inhibition curves of pET-30a-pelB-scFv-2C10/2E6/2H1

3 结 语

基于 AFB1 的毒性,其检测极限显得尤为重要。目前的检测分析方法中使用较广的是酶联免疫吸附法,该法以检测快速、灵敏、样品制备简单等优点而广受关注。在该检测方法中,抗体是核心试剂,以实验室保存的抗 AFB1 单克隆杂交瘤细胞株为原料构建不同的 scFv 基因。

目前,对于外源蛋白质的表达,*E. coli* 表达系统是应用较多、研究较多的,也最具有代表性的,*E. coli* 作为 AFB1scFv 的表达系统,*E. coli* 具有操作方便快速、实验周期不长、生产成本小等优点。

pelB 信号肽可以引导目的蛋白质在细胞周质内表达,并且采取一定的手段可以避免包涵体的形成,增加可溶蛋白质的表达,提高纯化效率^[26]。基于此,实验先将目的基因克隆到带有 pelB 信号肽的载体 pET-22b 上,再将 pET-22b 上的 pelB 信号肽序列和目的基因序列一同克隆到载体 pET-30a 上,这样是为了充分利用 pelB 信号肽的上述特性。基于此,实验将三种目的基因分别转化 *E. coli* 表达体系

进行蛋白质表达。最终本研究成功构建了三种重组载体 pET-30a-pelB-scFv-2C10/2E6/2H1,并将其转化到相应的表达细胞中进行蛋白质表达,以分析 scFv 的亲合力是否与其对应的单克隆抗体有关。实验结果显示,蛋白质最高表达量约为 34 mg/L。经 ELISA 实验结果表明,三种目的蛋白质 scFv-2C10/2E6/2H1 均显示出活性,检测灵敏度分别约为 40、50 $\mu\text{g/mL}$ 和大于 50 $\mu\text{g/mL}$ 。这说明随着单克隆抗体灵敏度的升高,其所对应的单链抗体的灵敏度也随之升高,原因可能是 scFv 的灵敏度与其碱基组成息息相关。其次,由于 2C10 和 2E6 的重链可变区的碱基组成是相同的,而二者的灵敏度却有一定的差距,这充分说明单链抗体与抗原的结合位点不仅存在于重链,轻链的影响也很大。所以,接下来的实验要想调高其灵敏度,还需要大量的实验分析和改进,分析其原因最终可能是因为 scFv 的自身编码基因的亲和力不够高,所以在未来的实验中,可能会采取基因工程技术手段,如基因定点突变或随机突变等对 scFv 的亲合力进行提高。

参考文献:

- [1] KENSLER T W, ROEBUCK B D, WOGAN G N, et al. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 120(1): 28-48.
- [2] VILLA P, MARKAKI P. Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from athens market: occurrence and risk assessment [J]. *Food Control*, 2009, 20(5): 455-461.
- [3] ZHENG M Z, RICHARD J L, BINDER J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins [J]. *Mycopathologia*, 2006, 161(5): 261-273.
- [4] ZHANG Huili, YANG Song, SU Junwei, et al. Different detections on peanut infected by *Aspergillus flavus* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(8): 868-874. (in Chinese)
- [5] LI Jinquan, MAO Xiujun, WANG Zhouping, et al. Nanogold labeling based novel detection method for aflatoxin B1 [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(5): 675-681. (in Chinese)
- [6] RAHMANI A, JINAP S, SOLEIMANY F, et al. Sample preparation optimization for the simultaneous determination of mycotoxins in cereals [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 232(4): 723-735.
- [7] BRAM V D G, SPATHS, DIETRICH H, et al. Biosensors and multiple mycotoxin analysis [J]. *Food Control*, 2003, 14(4): 251-254.
- [8] YE Y, ZHOU Y X, MO Z Z, et al. Rapid detection of aflatoxin B1 on membrane by dot-immunogold filtration assay [J]. *Talanta*, 2010, 81(3): 792-798.
- [9] YENTUR G, DEMIRHAN B E, OZKAN M G, et al. Determination of aflatoxins in peanut butter and sesame samples using high-performance liquid chromatography method [J]. *Eur Food Res Technol*, 2006, 224(2): 167-170.
- [10] WANG D, HU W H, XIONG Y H, et al. Multifunctionalized reduced graphene oxide-doped polypyrrole/pyrrolepropyl acid nanocomposite impedimetric immunosensor to ultra-sensitively detect small molecular aflatoxin B1 [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63(1): 185-189.
- [11] JI Y W, REN M L, LI Y P, et al. Detection of aflatoxin B1 with immunochromatographic test strips: enhanced signal sensitivity

- using gold nanoflowers[J]. **Talanta**, 2015, 142(3):206-212.
- [12] HE T, WANG Y R, LI P W, et al. Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol[J]. **Anal Chem**, 2014, 86(17):8873-8880.
- [13] WEINER L M, SURANA R, WANG S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy[J]. **Nat Rev Immunol**, 2010, 10(5):317-327.
- [14] MIN W K, NA K I, YOON J H, et al. Affinity improvement by fine tuning of single-chain variable fragment against aflatoxin B1 [J]. **Food Chem**, 2016, 209(21):312-317.
- [15] YE T, LIN Z, LEI H. High-level expression and characterization of an anti-VEGF165 single-chain variable fragment (ScFv) by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2008, 81(2):311-317.
- [16] HUDSON P J, KORTT A A. High avidity ScFv multimers; diabodies and triabodies[J]. **J Immunol Methods**, 1999, 231(1-2):177-189.
- [17] HUSTON J S, LEVINSON D, MUDGETT H M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1988, 85(16):5879-5883.
- [18] ZHAO Jun, TONG Dewen, LI Li, et al. Study on single antibody and its application in cancer diagnosis and treatment[J]. **Progress In Veterinary Medicine**, 2006, 27(1):35-38. (in Chinese)
- [19] LIU Yan. The research progress and application prospect of single antibody[J]. **China Institute of Veterinary Drug Control**, 2003, 37(11):42-44. (in Chinese)
- [20] LUO D, GENG M, NOUJAIM T, et al. An engineered bivalent single-chain antibody fragment that increases antigen binding activity[J]. **Biochemistry**, 1997, 121(5):831-834.
- [21] HUSTON J S, MCCARTNEY J, TAI M S, et al. Medical applications of single-chain antibodies[J]. **Int Rev Immunol**, 1993, 10(2-3):195-217.
- [22] 叶阳. 抗黄曲霉毒素 B1 抗体的研制、应用及差异分析研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2011:1-162.
- [23] ESSONO S, FROBERT Y, GRASSI J, et al. A general method allowing the design of oligonucleotide primers to amplify the variable regions from immunoglobulin Cdna[J]. **J Immunol Methods**, 2003, 279(1-2):251-266.
- [24] PONOMARENKO NA, PILLET D, PAON M, et al. Anti-idiotypic antibody mimics proteolytic function of parent antigen [J]. **Biochemistry**, 2007, 46(50):14598-14609.
- [25] LI B, YE J, LIN Y, et al. Preparation and identification of a single-chain variable fragment antibody against Newcastle diseases virus F48E9[J]. **Vet Immunol Immunop**, 2014, 161(3-4):258-264.
- [26] CHEN W F, HU L, LIU A P, et al. Expression and characterization of single-chain variable fragment antibody against staphylococcal enterotoxin A in *Escherichia coli*[J]. **Can J Microbiol**, 2014, 60(11):737-743.